

РСТ

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро



МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ
С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(51) Международная классификация изобретения⁶: G01N 33/92, C12Q 1/60	A1	(11) Номер международной публикации: WO 98/37424 (43) Дата международной публикации: 27 августа 1998 (27.08.98)
(21) Номер международной заявки: PCT/RU98/00010 (22) Дата международной подачи: 26 января 1998 (26.01.98) (30) Данные о приоритете: 97102570 20 февраля 1997 (20.02.97) RU (71)(72) Заявители и изобретатели: ПАРФЕНОВ Александр Сергеевич [RU/RU]; 105043, Москва, 4 Парковая ул., д. 17, кв. 22 (RU) [PARFENOV, Alexandr Sergeevich, Moscow (RU)]. ЛОПУХИН Юрий Михайлович [RU/RU]; 121170, Москва, Кутузовский пр., д. 45, кв. 31 (RU) [LOPUKHIN, Jury Mikhailovich, Moscow (RU)].		(81) Указанные государства: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, евразийский патент (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), патент ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), патент OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Опубликована <i>С отчетом о международном поиске.</i>

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING CHOLESTEROL IN THE SKIN TISSUE

(54) Название изобретения: СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТКАНЕВОГО ХОЛЕСТЕРИНА КОЖИ

(57) Abstract

Disclosed is a method for identifying cholesterol in the skin tissue, consisting in the preparation of a segment of skin surface, the application of the measured quantity of a mixture containing enzymes to the skin, its exposure, the evaluation of the concentration of cholesterol in a reaction solution, and the calculation of the concentration of cholesterol in the skin. A contact area of skin with the mixture is defined using a bottomless airtight container, the base of which is attached to the skin. The mixture, which is used in a buffer solution with a pH of 6.8, contains (in molecular weight) 2.0 to 2.5 % cholesterol oxidase, 0.04 to 0.06 % sodium deoxycholic acid, and 0.1 to 0.2 % 3-propane sulphonate-(dodecyldimethylammonium). The concentration of cholesterol in the reaction solution is then evaluated by measuring the level of hydrogen peroxide; said measurement may be performed by immersing an electrochemical monitor or colorimetric indicator into the reaction solution.

Способ определения тканевого холестерина кожи, включает подготовку участка поверхности кожи, нанесение на кожу дозированного количества ферментсодержащей смеси, экспозицию, оценку концентрации холестерина в реакционном растворе и расчет концентрации холестерина кожи, при этом, на участке поверхности кожи ограничивают площадь контакта кожи со смесью с помощью герметизируемой емкости без дна с основанием, фиксируемым на коже, в качестве смеси используют содержащий 2,0 - 2,5 ед холестериноксидазы, 0,04 - 0,06 масс % дезоксихолевокислого натрия, 0,1 - 0,2 масс % 3-(додецилдиметиламмоний)-пропансульфоната в буферном растворе при pH = 6,8, а оценку концентрации холестерина в реакционном растворе осуществляют путем измерения уровня перекиси водорода. Измерения уровня перекиси водорода могут осуществляться путем погружения электрохимического датчика или колориметрического индикатора в реакционный раствор.

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ.

AT	Австрия	FI	Финляндия	MR	Мавритания
AU	Австралия	FR	Франция	MW	Малави
BB	Барбадос	GA	Габон	NE	Нигер
BE	Бельгия	GB	Великобритания	NL	Нидерланды
BF	Буркина Фасо	GN	Гвинея	NO	Норвегия
BG	Болгария	GR	Греция	NZ	Новая Зеландия
BJ	Бенин	HU	Венгрия	PL	Польша
BR	Бразилия	IE	Ирландия	PT	Португалия
CA	Канада	IT	Италия	RO	Румыния
CF	Центральноафриканская Республика	JP	Япония	RU	Российская Федерация
BY	Беларусь	KR	Корейская Народно-Демократическая Республика	SD	Судан
CG	Конго	KR	Корейская Республика	SE	Швеция
CH	Швейцария	KZ	Казахстан	SI	Словения
CI	Кот д'Ивуар	LI	Лихтенштейн	SK	Словакия
CM	Кам рун	LK	Шри Ланка	SN	Сенегал
CN	Китай	LU	Люксембург	TD	Чад
CS	Чехословакия	LV	Латвия	TG	Того
CZ	Чешская Республика	MC	Монако	UA	Украина
DE	Германия	MG	Мадагаскар	US	Соединенные Штаты Америки
DK	Дания	ML	Мали	UZ	Узбекистан
ES	Испания	MN	Монголия	VN	Вьетнам

Способ определения тканевого холестерина кожи

Область техники

Изобретение относится к области медицины, точнее к способу исследования кожи биохимическими методами. Изобретение может быть использовано также в косметологии, фармакологии, криминалистике и т.п. для определения содержания холестерина в коже, как свободного, так и общего.

Предшествующий уровень техники

В условиях клиники определение холестерина кожи позволяет неинвазивно, т.е. без взятия образца крови или биопсийного материала оценивать уровень тканевого холестерина.

Известен способ определения на поверхности кожи различных химических веществ, находящихся в кровеносном русле человека или животного (глюкоза, алкоголь, лактат, гипоксантин). Способ включает введение под кожу фермента, иммобилизованного на поверхности силикона, прогрев до 38 - 44°C участка кожи и регистрацию локального изменения концентрации кислорода или перекиси водорода на коже с помощью электрохимического датчика (Патент США 4,458,686, А 61 В 5/00, опублик. июль 1984г.).

Недостаток известного способа - сложность введения под кожу иммобилизованного фермента, образование перекиси водорода непосредственно в тканях, что может привести к нежелательным последствиям (переход гемоглобина в метгемоглобин) - развития гипоксии.

Известен способ определения холестерина кожи, путем взятия образца ткани с последующей экстракцией холестерина. Метод позволяет определить не только количество общего холестерина, но и отдельно свободного и этерифицированного (Bouissou, H., Pieraggi, M.Th., Julian, M. Identifying arteriosclerosis and aortic atheromathosis by skin biopsy. Atherosclerosis, v.19, pp. 449-458).

Развитием этого метода является экстракционный метод, согласно которому экстракцию холестерина производят без забора

образца ткани непосредственно на участке живой кожи. В качестве экстрагента используют смесь этилового спирта с эфиром. Пробирку с экстрагентом прикладывают к поверхности кожи на несколько минут, липиды находящиеся в поверхностных слоях кожи растворяются и переходят в раствор экстрагента, после чего проводится выпаривание растворителя и определение веществ перешедших в жидкую фазу (Lopukhin Yu.M. The skin and atherosclerosis (a three-drop test). 1992. Gordon and Breach Science Publishers S.A. UK).

Содержание холестерина в эпидермисе отражает накопление холестерина в коже и коррелирует с содержанием последнего в аорте, а также с площадью поражения аорты при атеросклерозе (Lopukhin Yu.M. The skin and atherosclerosis (a three-drop test). 1992. Gordon and Breach Science Publishers S.A. UK). Таким образом, определение содержания холестерина в коже позволяет получить уникальную информацию о состоянии тканевого пула холестерина, а это чрезвычайно важно как с позиций ранней диагностики атеросклероза (доклинической стадии), так и для целей контроля за лечением больных атеросклерозом.

В фармакологии способ определения холестерина в коже позволяет проводить оценку эффективности лекарственных средств влияющих как на синтез холестерина в тканях (группа статинов), так и на его выведение из организма с помощью различных сорбентов.

Недостаток известного способа - необходимость проведения биопсии, контакт кожи с раствором экстрагентов, а также длительность проведения анализа.

Наиболее близким к предлагаемому является способ определения холестерина кожи, включающий подготовку участка поверхности кожи, нанесение на кожу или другой холестеринсодержащей поверхности) дозированного количества раствора - аффинно - ферментативного конъюгата общей структуры $A - C - B$, где A - соединение, способное связываться с холестерином (аффинат), C - связующий мостик или полимер, B - фермент, дающий в результате превращения соответствующего субстрата цветной продукт. Количество холестерина определяют по

интенсивности перехода красителя в окрашенную форму (Патент США 5,489,510, А 61 В 10/00, опублик. февраль 1996 г. - прототип).

Недостатки этого способа: - ограниченная область применения, т.е. невозможность определения этерифицированного холестерина, низкая специфичность анализа, а именно взаимодействие конъюгата не только с холестерином, но и с другими липидами.

Раскрытие изобретения

Задача, на решение которой направлено настоящее изобретение - повышение специфичности, упрощение и расширение области применения способа, увеличение точности определения холестерина в коже человека и других конденсированных средах.

Поставленная задача решена тем, что в способе определения холестерина кожи, включающем подготовку участка поверхности, нанесение на поверхность кожи дозированного количества водного раствора фермента с добавкой поверхностно-активных веществ, экспозицию, оценку концентрации холестерина в реакционном растворе и расчет концентрации холестерина кожи, согласно предложению, после подготовки участка поверхности ограничивают с помощью приспособления площадь контакта кожи с раствором фермента и поверхностно-активного вещества, в качестве раствора фермента с поверхностно-активным веществом используют для определения свободного тканевого холестерина композицию состава (мас.%) :

холестериноксидаза	2,0 - 2,5ед
дезоксихолевокислый натрий	0,04 - 0,06

3- (додecil-диметил-аммоний) -

-пропансульфонат	0,1 - 0,2
------------------	-----------

фосфатный буфер pH 6,8	остальное до 100%,
------------------------	--------------------

а для определения общего холестерина композицию состава (мас.%) :

холестериноксидаза	2,0 - 2,5 ед
--------------------	--------------

холестеринэстераза	3 - 5 ед
--------------------	----------

дезоксихолевокислый натрий	0,04 - 0,06
----------------------------	-------------

3- (додecil-диметил-аммоний) -

-пропансульфонат

0,1 - 0,2

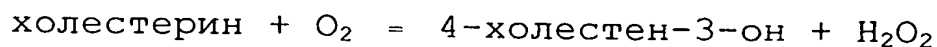
фосфатный буфер pH 6,8

остальное до 100%,

экспозицию раствора на коже для определения свободного холестерина проводят в течение 2 минут и 10 минут для определения общего холестерина, а оценку концентрации холестерина осуществляют путем прямого измерения концентрации перекиси водорода в реакционном растворе. Ограничение площади контакта кожи с раствором поверхностно-активного вещества осуществляют с помощью герметизируемой кюветы без дна с основанием, фиксируемым на коже.

Используют холестериноксидазу, полученную из различных источников (*Brevibacterium* sp., *Nocardia erythropolis*). Образующаяся в ходе взаимодействия холестерина с холестериноксидазой перекись водорода определяют с помощью электрохимического датчика или путем использования спектрофотометрической техники.

Холестериноксидаза катализирует окисление холестерина с участием молекулярного кислорода и образованием перекиси водорода:



При использовании смеси ПАВ - ионного детергента (дезоксихолевокислого натрия (ДОХ) в концентрации 0,04-0,06% и цвиттерионного детергента - 3-(додецил-диметил-аммоний)-пропансульфоната (ДАПС) в концентрации 0,1 - 0,2% выявлена оптимальная скорость и полнота окисления холестерина. Эта реакционная система позволяет повысить эффективность действия холестериноксидазы в результате снижения ингибирующего действия поверхностно - активных веществ и снизить расход дорогостоящих детергентов. Такая композиция детергентов обеспечивает доступность свободного холестерина и высокую скорость его окисления. Это позволило использовать при определении свободного холестерина сравнительно низкие концентрации холестериноксидазы - при применении кинетического варианта измерений всего 4-8 нмоль на мл реакционной смеси, а при определении по конечной

точке для проведения полного окисления холестерина за 10 мин достаточно 20 нмоль фермента на мл реакционной смеси.

Фотометрические методы позволяют достигать нижнего предела обнаружения субстратов оксидаз около 10^{-6} М.

Электрохимический датчик с холестериноксидазой, иммобилизованной на коллагеновой мембране позволяет определять концентрацию холестерина от 10^{-4} до 0,08мМ

(Патент СССР 622424, G 01 N 33/16, 1976 г. Bertrand et al. 1981 Multipurpose electrode with different enzyme bound to collagen films. Analyt.Chim. Acta. V.126.,pp.23-34).

Таблица.1

ДАПС, %	Дезоксихолат натрия(ДОХ), %									
	0		0,02		0,04		0,06		0,08	
	V	ОП	V	ОП	V	ОП	V	ОП	V	ОП
0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,08
0,10	27	0,067	51	0,08	47	0,071	41	0,069	33	0,068
0,15	помутнение раствора		58	0,108	53	0,118	41	0,109	38	0,093
0,20	помутнение		72	0,103	63	0,112	51	0,108	45	0,103
0,25	помутнение		74	0,110	65	0,105	53	0,108	44	0,097

В таблице 1 приведены данные, полученные при окислении свободного холестерина, содержащегося в контрольном растворе холестерина при разных соотношениях двух данных детергентов. Результаты приведены в единицах оптической плотности (ОП) и скорости реакции окисления по величине угла наклона кинетической кривой (V).

Краткое описание чертежей

Фиг.1 - герметизируемая кювета без дна

Фиг.2 - нанесение дозированного количества раствора

Фиг.3 - электрохимический электрод приводят в соприкосновение с раствором.

Варианты осуществления изобретения

Способ реализуется следующим образом. Предварительно участок кожи на котором проводится измерение протирается тампоном, смоченным этиловым спиртом. На подготовленном участке поверхности кожи фиксируется специальное приспособление - герметизируемая кювета без дна (Фиг.1.), где 1- кювета с резьбой для фиксации электрохимического датчика или крышки; 2- подложка, обеспечивающая фиксацию кюветы и ее герметичность на поверхности кожи. Кювета позволяет ограничить площадь поверхности кожи (1 см^2), предназначенной для анализа и нанести на этот участок (Фиг.2.) дозированное количество (объем $0,1 \text{ мл}$) раствора смеси фермента с поверхностно - активными веществами (ПАВ).

Экспозиция раствора на коже осуществляется течение двух минут. Во время экспозиции раствора, содержащего смесь фермента с ПАВ происходит наработка перекиси водорода, концентрация которой прямо пропорциональна содержанию холестерина. После экспозиции раствор, содержащий перекись водорода переносят на электрохимический электрод, где и происходит измерение концентрации образовавшейся перекиси водорода.

Предложен вариант способа, в котором электрохимический электрод приводят в соприкосновение с раствором, находящимся в кювете непосредственно на поверхности кожи (Фиг.3.).

В случае использования спектрофотометрического метода измерения концентрации перекиси водорода, раствор содержащий перекись водорода переносится в кювету фотометра, где находится проявляющая система (фермент пероксидаза и субстрат). Концентрацию перекиси определяют по величине оптической плотности раствора, прямо пропорциональной концентрации перекиси водорода. Определение концентрации перекиси водорода в жидкой фазе с использованием фотометра предпочтительно в лабораторных условиях. Вне лаборатории, например, в домашней диагностике возможно применение методов с использованием технологии «сухой» химии. С этой целью могут быть использованы колориметрические индикаторы на бумажных полосах (стрипы), позволяющие определять концентрацию перекиси водорода в диапазоне $0,2 - 20 \text{ мг/л}$, что полностью перекрывает необходимый диапазон концентраций.

При работе с колориметрическим индикатором (стрипом), бумажная полоса погружается в раствор проэкспонировавшегося фермента и ПАВ, находящегося на поверхности кожи в кювете. После погружения оценивают изменение цвета полосы, также определяемое концентрацией образовавшейся перекиси водорода либо с помощью цветной шкалы, либо с помощью портативного отражательного фотометра.

Определение количества холестерина на поверхности кожи возможно не только по количеству образующейся в ходе реакции окисления холестерина ферментом холестериноксидазы перекиси водорода, но и по величине потребления кислорода в ходе реакции, а также величине окисленного холестерина - холестенона. Технология определения перекиси водорода предпочтительна из-за соображений удобства и относительной простоты.

Важное диагностическое значение имеет определение не только свободного, но и этерифицированного холестерина, так как при ряде заболеваний меняется их соотношение. Определение этерифицированного холестерина позволяет проводить определение общего холестерина, являющегося суммой свободного и этерифицированного холестерина. С этой целью нами проводился ферментативный гидролиз эфиров холестерина ферментом холестеринэстеразой, полученным как из тканей поджелудочной железы, так и микробного происхождения. Для определения этерифицированного холестерина на поверхность кожи наносился раствор смеси ферментов - холестеринэстеразы с холестериноксидазой, содержащий ПАВ. Раствор экспонируют 10 минут после чего также проводят определение перекиси водорода одним из перечисленных выше методов.

Пример 1.

Определение свободного холестерина у здоровых добровольцев с помощью электрохимического датчика. На поверхность кожи ладони (область тенара) устанавливается кювета, показанная на фиг.1. Кювета позволяет фиксировать на поверхности кожи в 1 см^2 объем раствора фермента и ПАВ равный 0,1мл. Предварительно поверхность кожи протирается раствором этилового спирта. После установки кюветы в нее заливается раствор следующего состава (мас.%) :

холестериноксидаза	2,0 - 2,5 ед
дезоксихолевокислый натрий	0,06
3-(додecil-диметил-аммоний)-пропансульфонат	0,2
фосфатный буфер pH 6,8	остальное до 100%.

После инкубации раствора на поверхности кожи в течении двух минут забирается 0,05мл раствора и переносится на измерительную поверхность электрохимического датчика. Через 5 секунд считывается результат - величина тока пропорциональная содержанию, образовавшейся перекиси водорода. Пересчетное устройство позволяет выводить на жидкокристаллический экран величину содержания свободного холестерина на поверхности кожи выраженную либо в мкмоль/л, либо в мкг/см².

Определение холестерина с использованием метода (4) позволяет выявить одно, два или три окрашенных пятна. В таблице 2 приведены результаты одновременного проведения этих двух тестов. Видно, что колебания содержания свободного холестерина к коже испытуемых при изменении почти в два раза от 10,1 до 5,5 мкмоль/л дает положительную реакцию в один крест, тогда как при концентрации холестерина 9,3 мкмоль/л у 4-го испытуемого выявлена реакция в два положительных креста (++) .

Таблица 2.

№ испытуемых	Свободный холестерин мкмоль/л	Трех капельный тест в крестах
1.	10,1	(+)
2.	6,8	(+)
3.	5,5	(+)
4.	9,3	(++)
5.	7,1	(+)

Пример 2. Определение свободного холестерина у больных стенозирующим атеросклерозом с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца (ИБС). При использовании технологии, описанной в примере 1 уровень свободного холестерина кожи у больных ИБС колебался в пределах от 18,7 до 35,8 мкмоль/л (см. Табл. 3.)

Таблица 3.

№ больных ИБС	Свободный холестерин мкмоль/л	Трех капельный тест в крестах
1.	22,5	(++)
2.	18,7	(++)
3.	27,4	(+++)
4.	28,7	(+++)
5.	31,9	(+++)
6.	20,7	(+++)
7.	26,3	(++)
8.	25,8	(++)
9.	35,8	(+++)
10.	20,1	(++)
11.	25,0	(++)
12.	24,9	(+++)
13.	29,1	(++)
14.	21,1	(++)

Пример 3. Определение свободного холестерина с помощью специализированной бумажной полосы. На поверхность кожи ладони (область тенара) установлена кювета, позволяющая фиксировать на поверхности кожи в 1 см² объем раствора фермента и ПАВ равный 0,1мл. Предварительно поверхность кожи протирается раствором этилового спирта. После установки кюветы в нее заливается раствор холестериноксидазы и ПАВ после инкубации в течении двух минут в нее обмакивается специализированная бумажная полоса. Результат определения содержания свободного холестерина кожи считывался с помощью калибровочной цветной шкалы, либо по показаниям отражательного фотометра.

Пример 4. Определение общего холестерина (суммы свободного и этерифицированного) холестерина кожи. На поверхность кожи ладони установлена кювета, фиксирующая на поверхности кожи заданный объем следующего раствора:

холестериноксидаза	2,0 - 2,5 ед.
холестеринэстераза	3 - 5 ед.
дезоксиколевокислый натрий	0,04

3- (додецил-диметил-аммоний) -пропансульфонат 0,1
фосфатный буфер pH 6,8 остальное до 100%.

После чего кювета закрывается специальной крышкой, так как время экспозиции в этом случае 10 минут и за это время может произойти испарение, что приведет к концентрированию растворов. В среднем в контрольной группе содержание общего холестерина превышает на 10-20% величину свободного холестерина, т.е. величина этерифицированного холестерина составляет 10 - 20% от общего холестерина кожи.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

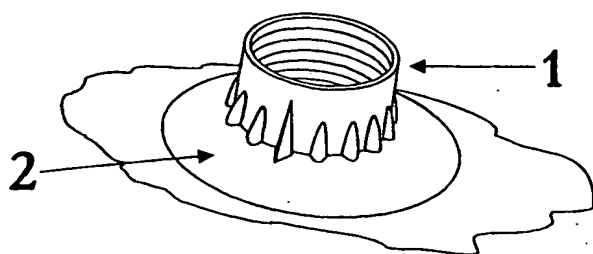
1. Способ определения тканевого холестерина кожи, включающий подготовку участка поверхности кожи, нанесение на кожу дозированного количества ферментсодержащей смеси, экспозицию, оценку концентрации холестерина в реакционном растворе и расчет концентрации холестерина кожи, отличается тем, что на участке поверхности кожи ограничивают площадь контакта кожи со смесью с помощью герметизируемой емкости без дна с основанием, фиксируемым на коже, в качестве смеси используют содержащий 2,0 - 2,5 ед холестериноксидазы, 0,04 - 0,06 масс % дезоксихолевокислого натрия, 0,1 - 0,2 масс % 3-(додецилдиметиламмоний)-пропансульфоната в буферном растворе при pH = 6,8, а оценку концентрации холестерина в реакционном растворе осуществляют путем измерения уровня перекиси водорода.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в композицию дополнительно вносят 3 - 5 ед. холестеринэстеразы.

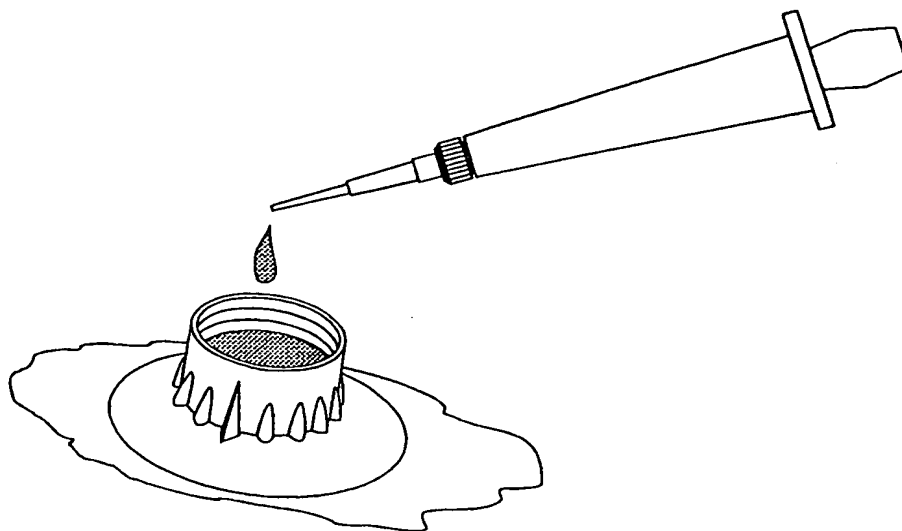
3. Способ по п.1-2, отличающийся тем, что для измерения уровня перекиси водорода осуществляют спектрофотометрически после добавления в реакционный раствор пероксидазы с субстратом.

4. Способ по п.1-2, отличающийся тем, что для измерения уровня перекиси водорода осуществляют путем погружения электрохимического датчика в реакционный раствор.

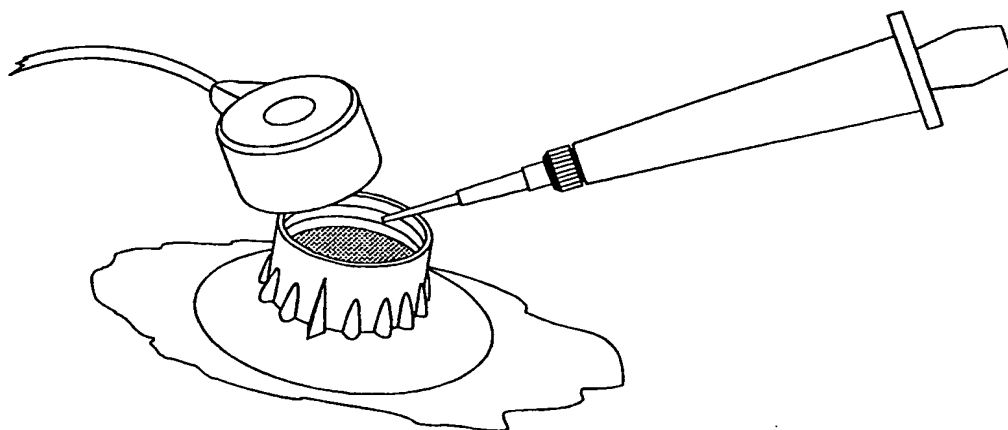
5. Способ по п.1-2, отличающийся тем, что для измерения уровня перекиси водорода осуществляют путем погружения колориметрического индикатора в реакционный раствор.



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 98/00010

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N 33/92, C12Q 1/60 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N 33/92, C12Q 33/48 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SU 637097 A (BERINGER MANNKHAIM GMBH), 5 December 1978 (05.12.78), claim 1.	1, 3-5
A	SU 664536 A (BERINGER MANNKHAIM GMBH), 25 May 1979 (25.05.79), claim 1.	1
A	US 4226713 A (JACK M. GOLDBERG), 7 October 1980 (07.10.80), claims 4, 5.	1
A	US 5587295 A (2860601 CANADA INC.), 24 December 1996 (24.12.96), claim 3.	1-2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 March 1998 (19.03.98)		Date of mailing of the international search report 26 March 1998 (26.03.96)
Name and mailing address of the ISA/ RU Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 98/00010

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

G01N 33/92, C12Q 1/60

Согласно международной патентной классификации (МПК-6)

B. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-6:

G01N 33/92, C12Q 33/48

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, поисковые термины):

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	SU 637097 A (БЕРИНГЕР МАННХАЙМ ГМБХ) 05.12.78, п.1 формулы	1,3-5
A	SU 664536 A (БЕРИНГЕР МАННХАЙМ ГМБХ) 25.05.79, п.1 формулы	1
A	US 4226713 A (JACK M.GOLDBERG) Oct. 7, 1980, п.п.4,5 формулы	1
A	US 5587295 A (2860601 CANADA INC.) Dec. 24, 1996, п.3 формулы	1-2

☐ последующие документы указаны в продолжении графы C.

☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники

"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

"У" документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска
19 марта 1998 (19.03.98)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске
26 марта 1998 (26.03.98)

Наименование и адрес Международного поискового органа:
Федеральный институт промышленной собственности,

Россия, 121858, Москва, Бережковская наб., 30-1

Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:

И. Хрусталева

Телефон №: (095)240-5888

Форма PCT/ISA/210 (второй лист) (июль 1992)